LUCIANA MACHADO DZIK

O efeito do Equinocromo A (EchA), derivado de ouriço-do-mar *Lytechinusvariegatus* (Lamarck, 1816), na biologia de células tumorais mamárias.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências

São Paulo

2019

LUCIANA MACHADO DZIK

O efeito do Equinocromo A (EchA), derivado de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816), na biologia de células tumorais mamárias.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas

São Paulo

2019

RESUMO

DZIK, L. M. O EFEITO DO EQUINOCROMO A (ECHA), DERIVADO DE OURIÇO-DO-MAR *L. VARIEGATUS*, NA BIOLOGIA DE CÉLULAS TUMORAIS MAMÁRIAS. 2019. 100 páginas. Tese de Doutorado em Biologia De Sistemas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer de mama, em mulheres, é o tipo tumoral mais frequente, e a primeira causa de morte associada ao câncer. As decisões de tratamento baseiam-se na classificação clínica do subtipo tumoral e envolvem hormônio/imunoterapia, radio/quimioterapia e mastectomia. No entanto, as taxas de recorrência do tumor são altas reforçando a importância de estudos visando novas abordagens terapêuticas. Entre essas abordagens, destaca-se a busca de novos fármacos anti-neoplásicos de origem natural, especialmente derivados de organismos marinhos, como os equinodermos que representaram, em 2016, 42% de todas as novas moléculas de origem marinha. Entre essas moléculas está o Equinocromo A (EchA) que foi identificado como um potente antiviral, antibacteriano, antioxidante e cardioprotetor. Estruturalmente, EchA é classificado como naftoquinona, e essa classe de moléculas é conhecida por exercer atividade antitumoral. Desta forma, objetivou-se avaliar a ação antitumoral do EchA, derivado de ouriço-do-mar *L. variegatus*, em linhagens humanas derivadas de carcinoma mamário. Para tanto, o EchA foi purificado através de RP-HPLC, seguido por LC-MS e diluído em etanol na concentração estoque de 10mM para o tratamento celular. A primeira etapa do trabalho envolveu a determinação do IC50 do EchA em linhagens celulares normais (fibroblastos e MCF10A) e tumorais (MDA-MB-231 e MCF7). Posteriormente, as células tumorais foram submetidas a ensaios *in vitro* com diferentes concentrações de EchA para determinar o efeito do composto na morfologia celular, viabilidade, migração e adesão. O potencial migratório e invasivo das células MDA-MB-231 tratadas com EchA foi avaliado por meio de ensaio de feridas, *transwell*, quantificação da ativação de RhoGTPase e concentração de citocinas IL-6, IL-8 e IL-1 β . Observando alterações na secreção dessas citocinas, optou-se por analisar o efeito antiangiogênico do EchA nas células HUVEC. Adicionalmente, o efeito coadjuvante de EchA foi avaliado durante o tratamento de MDA-MB-231 com tamoxifeno, de modo a testar se

EchA aumentaria os efeitos citotóxicos deste quimioterápico. Os resultados demonstram que altas concentrações de EchA são citotóxicas para todas as linhagens celulares estudadas, sendo mais pronunciadas em células MCF10A normais e menos pronunciadas em fibroblastos. Entre as linhagens tumorais, a MDA-MB-231 apresentou maior resistência em relação a MCF7. Adicionalmente, o EchA afeta a distribuição de F-actina de maneira dose-dependente em ambas as linhagens tumorais, sendo mais pronunciada nas células MDA-MB-231, que apresentaram uma diminuição no potencial de formação de colônias. Além disso, baixas concentrações de EchA alteram a distribuição de F-actina, α -tubulina e fosfo-FAK, além de diminuir a ativação de Cdc42 nessas células agressivas, diminuindo o potencial migratório, invasivo e de adesão, sem afetar a viabilidade. Por outro lado, quando associado ao tratamento com tamoxifeno, o EchA não se mostrou capaz de potencializar de forma expressiva os seus efeitos citotóxicos. Após a análise das citocinas, constatou-se que o EchA foi capaz de diminuir a secreção de IL-6, IL-8 e IL-1 β pelas células MDA-MB-231 em aproximadamente 40, 25 e 50%, respectivamente, indicando que o composto possa ter atividade antiangiogênica. O ensaio de angiogênese foi realizado com células endoteliais em co-cultura com fibroblastos em ambiente tridimensional de gel de fibrina. Células HUVECs tratadas com meio condicionado de MDA-MB-231 expostas ao EchA apresentaram diminuição no brotamento vascular, indicando diminuição na angiogênese. Em conjunto, nossos dados demonstram que o EchA inibe o potencial de células MDA-MB-231 em induzir angiogênese nas células HUVECs, sugerindo que o EchA possa ser uma terapia adjuvante promissora para o câncer de mama, possivelmente atuando de forma indireta no desenvolvimento tumoral, inibindo a progressão por meio da diminuição da angiogênese.

Palavras chave: Câncer de mama, Equinocromo A, Efeito antitumoral, Quimioterapia adjuvante, Moléculas bioativas.

ABSTRACT

DZIK, L. M. THE ROLE OF ECHINOCHROME A (ECHA), DERIVED FROM SEA URCHIN *L. VARIEGATUS*, ON BREAST CANCER TUMOR CELLS. 2019. 100 pages. PhD thesis in Systems Biology). Biomedical Science Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Breast cancer is the most frequent tumor type in women, being the leading cause of cancer-related death in females. Treatment decisions are based on the clinical classification of the tumor subtype and involve hormone and immunotherapy, radio/chemotherapy, and mastectomy. However, tumor recurrence rates are high, especially in patients with triple-negative breast cancer, leading many studies to look for new therapeutic approaches. Thus, considerable efforts have been made in the search for new anti-neoplastic drugs of natural origin, mainly derived from marine organisms, since this habitat is a rich source of bioactive secondary metabolites, which have chemical structural diversity. In 2016, the echinoderms stood out as a source for the discovery of 42% of all new molecules of marine origin. Among them, Echinochrome A (EchA) has been identified as potent antiviral, antibacterial, antioxidant, and cardio protective. Structurally, EchA is classified as naphthoquinone, and this class of molecules is known to exert antitumor activity. Based on this, we decided to analyze the antitumor properties of this compound in the treatment of mammary tumor cells. For this, EchA was purified by RP-HPLC, followed by LC-MS, and diluted in ethanol to a stock concentration of 10mM for cell treatment. The first step of the work involved the determination of the EchA IC₅₀ in normal-like cell lines (fibroblasts and MCF10A cells), and tumor cells (MDA-MB-231 and MCF7), which were subjected to *in vitro* assays with different concentrations of EchA to determine the effect of the compound on cell morphology, viability, migration, and adhesion. MDA-MB-231 cells were chosen to have their migratory potential evaluated by wound testing, transwell, and quantification of Rho GTPase activation. The concentration of cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 β were analyzed in the conditioned medium of those cells, exposed or not to EchA. And changes in the secretion of these cytokines lead us to analyze the antiangiogenic effect of EchA on HUVEC cells. In addition, the adjuvant effect of EchA was also evaluated during tamoxifen treatment of MDA-MB-231 in order to test if EchA could increase the cytotoxic effects of this

chemotherapy. Our data show that high concentrations of EchA are cytotoxic to all studied cell lines, being more pronounced in normal MCF10A cells and less pronounced in fibroblasts. Among the tumor lines, MDA-MB-231 presented higher resistance compared to MCF7. Additionally, EchA affects the distribution of F-actin in both tumor strains; this change is more pronounced in MDA-MB-231 cells, which showed a decreased colony formation potential. In addition, low concentrations of EchA alter the distribution of F-actin, α -tubulin, and pFAK, and also decrease Cdc42 activation in MDA-MB-231 cells, decreasing their migration, invasion and adhesion potential without affecting viability. On the other hand, when associated with tamoxifen treatment, EchA did not potentiate its cytotoxic effects. After cytokine analysis, we found that EchA was able to decrease the secretion of IL-6, IL-8 and IL-1 β by MDA-MB-231 cells by 40, 25 and 50%, respectively, indicating that the compound may have antiangiogenic activity. Thus, angiogenesis assay was performed with endothelial cells in co-culture with fibroblasts in a three-dimensional fibrin gel environment. The sprouting of HUVECs cells treated with MDA-MB-231 conditioned medium exposed to EchA was decreased, indicating reduced angiogenesis. Taken together, our data demonstrate that EchA inhibits the potential of MDA-MB-231 cells to induce angiogenesis in HUVECs cells, suggesting that EchA may be a promising adjunctive therapy for breast cancer, possibly acting indirectly on tumor development, through inhibition of tumor progression by decreasing angiogenesis.

Keywords: Breast cancer, Echinochrome A (EchA), Antitumor effect, Adjuvant chemotherapy, Bioactive compound

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015), o câncer é uma das neoplasias que apresenta maior taxa de mortalidade na população mundial, sendo responsável por 1 a cada 6 óbitos registrados, e destacando-se como a principal barreira ao aumento de expectativa de vida no século 21. Aproximadamente 70% das mortes associadas ao câncer ocorrem em países em desenvolvimento, porém, os países desenvolvidos também enfrentam realidades preocupantes, nos Estados Unidos, estima-se que, em 2018, 600 mil mortes foram associadas ao câncer (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

Nas últimas décadas, a incidência de casos da doença e mortalidade associada ao câncer vem aumentando, tanto devido ao aumento populacional e maior expectativa de vida, quanto por consequência do aumento da exposição aos fatores de risco. Recentemente, Bray e colaboradores (2018), baseando-se em dados da Globalcan e da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IACR, do inglês *Internacional Agency for Research on Cancer*), estimaram o surgimento de 18 milhões de novos casos de câncer em 2018, com 9,6 milhões de mortes. Dentre os subtipos tumorais mais comuns, ao considerarmos ambos os sexos, o mais frequente é o câncer de pulmão, com 2,09 milhões de casos, seguido pelo câncer de mama, com 2,08 milhões.

Além das preocupações com a saúde pública, as neoplasias geram um grande impacto econômico, principalmente em países em desenvolvimento. Dados da OMS mostram que, em 2010, o valor ultrapassou US\$1 trilhão de dólares.

1.1 O câncer no Brasil

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde (INCA/MS), em 2018 ocorreram 582.590 novos casos de câncer, incluindo o câncer de pele não melanoma. Deste total, 282.450 foram no sexo feminino, sendo um total de 202.040 casos se desconsiderarmos o câncer de pele não melanoma.

Dentre os tipos tumorais mais frequentes no sexo feminino, destaca-se o câncer de mama, que ocupou a primeira posição no ranking dos novos casos, com 59.700 diagnósticos, o que equivale à aproximadamente 30% de todos os casos relatados. Uma

análise realizada pelo INCA, por região, aponta que o câncer de mama é o mais frequente na região Sul (73,07 casos a cada 100 mil mulheres), seguido pela região Sudeste (69,5/100 mil), Centro-Oeste (51,96 casos/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil mulheres). Na região Norte, o índice é de 19,21/100 mil casos, sendo o segundo tipo de tumor mais frequente da região, estando atrás apenas do câncer de colo do útero.

1.2 O câncer de mama: Incidência e subtipos tumorais

Mundialmente, dentre os tipos tumorais mais incidentes no sexo feminino, o câncer de mama destaca-se como o mais frequente em 154, dos 185 países analisados pela *Global Cancer Observatory* (Figura 1), sendo a principal causa de mortes associadas ao câncer em mulheres (Figura 2).

Figura 1: Mapa global representando o tipo de câncer mais comum em mulheres, em cada um dos 185 países. Fonte: *World Health Organization*.

Estima-se que 1, a cada 4 tumores diagnosticados em mulheres seja mamário. Se considerarmos ambos os sexos, o câncer de mama fica na segunda posição do ranking de tumores mais incidentes, acometendo um pouco mais de 2 milhões de pacientes – o que contempla aproximadamente 11,6% dos casos – e sendo responsável por 630 mil mortes, o que equivale a 6,6% do total dos pacientes diagnosticados.

Figura 2: Distribuição do número de casos (incidência), e total de mortes (mortalidade) associadas aos 10 tipos de câncer mais comuns em mulheres. Fonte: *World Health Organization*.

Apesar dos fatores de risco hereditários, as elevadas taxas de incidência de câncer de mama são frequentemente associadas a alterações na menstruação (menarca precoce, e/ou menopausa tardia), ingestão de hormônio exógeno (uso de contraceptivos orais, e terapia de reposição hormonal), nutrição (ingestão de álcool) e antropometria (ganho de peso durante a vida adulta, e distribuição de gordura corporal). Por outro lado, aleitamento materno e atividade física, são fatores de proteção conhecidos (BRAY et al., 2018).

Tratando-se de uma doença multifatorial, uma análise mais detalhada do genoma de tumores mamários revela uma complexa rede de alterações moleculares, resultando no reconhecimento de diversos subtipos “moleculares” de câncer de mama. No dia a dia clínico, a obtenção de informações provenientes do *screening* genético de cada paciente não é viável, de forma que se adotou, desde a 12th *St Gallen International Breast Cancer Conferende* (2011), um protocolo “simplificado” para a classificação deste tipo de tumor por meio da técnica de imuno-histoquímica.

Como mostram Goldhirsch e colaboradores (2011), os tumores mamários são classificados de acordo com a expressão de 4 marcadores: receptor de progesterona (PR, do inglês *progesterone receptor*), receptor de estrógeno (ER, do inglês *estrogen receptor*), receptor de fator de crescimento epidermal humano (HER2, do inglês *human epidermal growth factor receptor, type 2*), e o índice de proliferação celular por meio de marcação da proteína Ki-67.

Assim, os tumores são classificados em: Luminal A quando apresentam PR e/ou ER-positivo, HER2-negativo e baixo Ki-67 (<14%); Luminal B do tipo HER2-negativo quando PR e/ou ER-positivo, HER2-negativo e alto Ki-67; Luminal B do tipo HER2-positivo quando apresentam PR e/ou ER-positivo, HER2 superexpresso e qualquer expressão de Ki-67; HER2-positivo quando PR e/ou ER-negativo e HER2 superexpresso; e Triplo negativo (TNBC, do inglês *triple-negative breast cancer*) quando ER, PR e HER2-negativos (GOLDHIRSCH et al., 2011; GUIU et al., 2012) (Tabela 1).

PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA	CLASSIFICAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA (ST GALLEN)
LUMINAL A	"LUMINAL A"
	ER e/ou PR positivo HER2 negativo Ki-67<14%
LUMINAL B	"LUMINAL B (HER2 negativo)"
	ER e/ou PR positivo HER2 negativo Ki-67>14%
	"LUMINAL B (HER2 positivo)"
	ER e/ou PR positivo Any Ki-67 HER2 superexpresso
HER-2	"HER2 positivo (não luminal)"
	HER2 superexpresso ER e PR ausentes
BASAL-LIKE	"TRIPLO-NEGATIVO"
	ER e PR ausentes HER2 negativo

Tabela 1. Subtipos moleculares do câncer de mama. Adaptada de (Guiu et al. 2012)

1.3 O Câncer de mama: Tratamento

A classificação clínica é essencial, uma vez que parâmetros relacionados à expressão destes 4 marcadores, em combinação com a avaliação de presença de metástase no linfonodo sentinela, são etapas importantes para a predição de risco de recidiva tumoral, e determinação da abordagem terapêutica.

De forma geral, o tratamento do carcinoma mamário envolve desde abordagens menos invasivas com hormônio/imunoterapia, até radio/quimioterapia (sendo neoadjuvante se administrada antes da cirurgia, e adjuvante se administrada depois), combinados ou não com mastectomia parcial ou total.

O grupo de melhor prognóstico é o luminal, e apresenta boas respostas à hormonioterapia, seguido pelo grupo HER2, que apresenta um pior prognóstico em relação ao primeiro, e uma melhor resposta à quimioterapia. O grupo triplo-negativo e os tumores

ER+/PR+ com superexpressão de Ki-67, por outro lado, apresentam o pior prognóstico (DAI et al., 2016).

Dados clínicos mostram que, tanto a sobrevida livre de doença, quanto a sobrevida global, são maiores em pacientes com tumores positivos para receptores hormonais (ER e PR), tais como luminal A e B. Isso porque, além de serem responsivos à hormônio, estes tipos tumorais – que representam 65 a 75% dos casos de câncer de mama – costumam apresentar características menos agressivas, como um alto grau de diferenciação e baixo índice de proliferação. Assim, a utilização de moduladores de receptores de estrógeno como o Tamoxifeno, ou inibidores da síntese endógena de estrógeno, como os inibidores de aromatase, mostram-se eficientes abordagens.

Conforme revisado por Bordonado e colaboradores (2018), a superexpressão de HER2 ocorre em 20 a 25% dos casos de câncer de mama, e está correlacionada com uma baixa sensibilidade à quimioterapia. Desta forma, opta-se pelo tratamento com radioterapia, hormonioterapia ou quimioterapia com compostos taxanos, combinada a abordagens anti-HER2, como a administração do anticorpo monoclonal trastuzumab (Herceptina®), ou do inibidor tirosina kinase de HER2, lapatinib. Outra abordagem envolve a administração de 2 anticorpos monoclonais ao mesmo tempo, como trastuzumab + pertuzumab (BORDONARO et al., 2018).

Englobando apenas de 12 a 20% dos casos de câncer de mama, o subtipo tumoral triplo negativo é o carcinoma ductal mais agressivo, e com pior prognóstico, apresentando uma média de sobrevida global menor de 2 anos após o diagnóstico (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010). Corroborando com estes dados, em 2017, Xiaoxian Li e colaboradores avaliaram o SEER (do inglês: *Surveillance, Epidemiology, and End Results*) de 2049 pacientes do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, e concluíram que os pacientes triplo-negativos apresentam menor sobrevida global quando comparados aos subtipos não-triplo negativos (LI et al., 2017). Isso porque, além de apresentar uma alta instabilidade genômica, causada por deficiências na maquinaria de reparo de DNA, combinada a um alto índice proliferativo, alto grau de invasividade e baixo grau de diferenciação, estes tumores apresentam ausência de receptores ER, PR e HER2, fazendo com que não haja um alvo terapêutico bem definido (BORDONARO et al., 2018).

Apesar de inicialmente sensível à quimioterapia, o risco de recorrência em

pacientes que não atingem a resposta patológica completa é alto, de forma que o tratamento do subtipo tumoral triplo negativo venha sendo modificado e melhorado constantemente, passando desde a abordagem CMF – ciclofosfamida/metotrexato/fluoracil até combinações quimioterápicas com taxanos – como o paclitaxel e docetaxel (CAREY et al., 2007).

Infelizmente, independente do procedimento adotado, o índice de cura do câncer de mama permanece baixo e pouco satisfatório. Assim, estes tipos de abordagens mostram-se limitadas por apresentarem pouca eficácia, alta toxicidade e eventual resistência multidroga, de forma que a busca de novas terapias para o tratamento do câncer seja um dos principais objetivos de diversos trabalhos envolvendo esta patologia.

1.4 O processo de tumorigênese

Tecnicamente, o câncer é resultado de um processo multifatorial, no qual uma célula normal se transforma - de forma progressiva - em uma célula tumoral, adquirindo uma sucessão de vantagens biológicas (Figura 3), que fazem com que as células deixem de apresentar um fenótipo normal, e passem a apresentar características mais agressivas, permitindo o crescimento tumoral e disseminação metastática do mesmo.

Neste sentido, o tumor deixa de ser visto como uma massa de células proliferativas, e passa a ser classificado como um tecido complexo formado por diferentes populações celulares que interagem através de diferentes sinalizações. Desta forma, o estroma tumoral também passa a ser percebido como um componente ativo da tumorigênese, contribuindo para o desenvolvimento de algumas das habilidades adquiridas por células normais durante a transformação, destacando assim a importância do microambiente tumoral (GOMES et al., 2019).

Segundo revisado por Hanahan e Weinberg (2011), o desenvolvimento tumoral pode ser dividido em 3 diferentes estágios: iniciação, promoção e progressão tumoral. Em estágios iniciais (iniciação), as células normais sofrem alterações genéticas (como mutações, rearranjos cromossômicos) e/ou epigenéticas (como alterações em histonas, metilação de DNA), que fazem com que as células entrem na segunda etapa do desenvolvimento tumoral: promoção, na qual as células perdem o controle de sinais de

manutenção de homeostase, e passam a proliferar descontroladamente, de forma crônica e sustentada, adquirindo imortalidade replicativa.

Este passo é fundamental para o desenvolvimento tumoral, e o estímulo mitótico ocorre de diferentes formas, que envolvem desde a sinalização autócrina para a proliferação; estimulação das células normais a produzirem fatores de crescimento destinados às células tumorais; indução de aumento no número de receptores disponíveis na superfície de células tumorais - tornando as células hiperresponsivas -, e até mesmo a apresentação de defeitos no mecanismo de *feedback* negativo e evasão dos sistemas de supressão tumoral, como por exemplo, a morte celular programada - denominada apoptose. Este processo de morte programada é controlado por reguladores apoptóticos como o TP53, e antiapoptóticos como BCL-2, que, em geral, encontram-se desregulados nos tumores, fazendo com que a célula se torne refratária a mecanismos de apoptose.

Com o aumento da massa celular proliferativa, o tumor passa a necessitar de um maior aporte de oxigênio e nutrientes, e isso é feito através do surgimento de novos vasos sanguíneos, em um processo denominado angiogênese. Este processo é controlado por fatores crescimento como o VEGF (do inglês: *vascular endothelial growth factor*), e encontra-se permanentemente ativado nos tumores, permitindo que a vascularização tumoral esteja em brotamento contínuo (*sprouting*), para que haja suprimento das necessidades metabólicas das células, fornecendo O₂ e nutrientes, que facilitam a progressão tumoral.

A etapa final do desenvolvimento tumoral envolve a aquisição de fenótipo invasivo e, posteriormente, metástase. Nesta fase, denominada promoção, as células deixam de expressar marcadores epiteliais - tais como E-caderina presentes nas junções célula-célula - e passam a expressar marcadores mesenquimais como a N-caderina, em um processo denominado transição epitélio-mesenquimal, que culmina em perda de polaridade celular, e aumento de potencial migratório. Este processo é crítico na tumorigênese, principalmente por permitir ao tumor a aquisição de capacidade invasiva e metastática. Como resultado, ocorre a disseminação por tecidos adjacentes e também metástase à distância, grande responsável pelo óbito de pacientes com câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Figura 3: Os hallmarks do câncer. Adaptado de (Hanahan and Weinberg 2011). Esquema representativo do processo de transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, durante a tumorigênese. Inicialmente, as células adquirem a capacidade de 1. reprogramar o metabolismo energético, com a finalidade de suportar o segundo passo da tumorigênese, que envolve 2. uma proliferação crônica sustentada, onde a célula torna-se capaz de evadir os mecanismos de 3. supressão tumoral e 4. evitando a destruição pelo sistema imune, quando fogem de linfócitos T, B, macrófagos e células NKs. Juntas, estas etapas fazem com que as células apresentem 5. imortalidade replicativa. Em paralelo, 6. o microambiente inflamatório do tumor, juntamente com a 9. instabilidade genômica, promovem ainda mais o desenvolvimento tumoral, aumentando a agressividade das células tumorais, que adquirem a capacidade de 7. invasão e metástase, e 10. resistência à morte celular. Adicionalmente, elementos do microambiente também 8. passam a estimular o processo de angiogênese.

Figura 3: Os hallmarks do câncer. Adaptado de (Hanahan and Weinberg 2011)

Alguns *hallmarks* envolvidos na tumorigênese mamária, e relevantes para este estudo, serão discutidos a seguir.

1.5 A progressão tumoral mamária

De forma simplificada, a interação tumor-estroma durante a progressão do tumor mamário se dá da seguinte forma: o tecido sadio (Figura 4A) é formado por um ducto mamário normal, composto por células epiteliais justapostas e células mioepiteliais subjacentes, apoiadas em matriz extracelular fibrilar e tecido conjuntivo contendo capilares e fibroblastos.

Conforme descrito por Kalluri e Zeisberg (2006), uma transformação maligna que acarrete em proliferação descontrolada de células epiteliais sem que haja extravasamento das mesmas para o exterior do lúmen ductal origina o carcinoma ductal *in situ* (Figura 4B). Nesta etapa, a parede do ducto torna-se irregular, a camada de células mioepiteliais continua apresentando fenótipo normal e o tecido conjuntivo circundante passa a apresentar-se mais fibroso, com deposição de MEC fibrilar e início do acúmulo de fibroblastos.

Figura 4: Os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário. A - Mama normal: ducto mamário normal, composto por células epiteliais e mioepiteliais apoiadas em MEC fibrilar e tecido conjuntivo contendo capilares e fibroblastos. B - Carcinoma ductal in situ: presença de células tumorais proliferativas no lúmen do ducto mamário, e tecido circundante fibroso, caracterizado pela deposição de MEC fibrilar e presença de muitos fibroblastos. C - Carcinoma ductal invasivo: ruptura da membrana basal, liberação de células tumorais para o exterior dos ductos, que passam a apresentar-se de forma irregular, estroma circundante contendo miofibroblastos, infiltrado inflamatório e novos capilares. D - Carcinoma mamário em estágio avançado: Células tumorais adquirem a capacidade de invadir o estroma denso e fibroso que circunda o tumor, deixando o sítio primário - retirada de (Kalluri and Zeisberg 2006).

Figura 4: Os diferentes estágios de progressão do carcinoma mamário.

A medida que o tumor se torna mais agressivo, ele adquire propriedades invasivas (Figura 4C), sendo denominado carcinoma ductal invasivo. Neste momento, a membrana basal é rompida, tornando os ductos irregulares e permitindo o extravasamento de células tumorais, e o estroma passa a ser povoado por miofibroblastos, células do sistema imune (infiltrado inflamatório) e capilares sanguíneos recém-formados por meio de processos angiogênicos. A última etapa da transformação maligna do tecido mamário (Figura 4D) envolve a aquisição de características metastáticas pelas células tumorais mamárias, que se tornam aptas a invadir o estroma denso e fibroso que circunda o sítio tumoral primário (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

Desta forma, fica evidente que a tumorigênese depende não apenas da aquisição de malignidade pelas células tumorais, como também alterações na composição do microambiente ao qual o tumor está inserido.

1.5.1 Microambiente tumoral

Conforme já mencionado, nos últimos anos, o tumor deixou de ser visto como um agregado de células tumorais, e passou a ser visto como um sistema complexo, onde a interação entre as células tumorais os componentes estromais - composto por células tumorais, células de infiltrado inflamatório como, células associadas ao tumor, matriz extracelular e fatores solúveis como citocinas e fatores de crescimento - mostra-se fundamental para o direcionamento da tumorigênese (DANG; PRECHTL; PEARSON, 2011; HOSHINO et al., 2015; OBENAUF et al., 2015).

Fisicamente, este complexo sistema que possibilita a interação entre células tumorais, células estromais, componentes da matriz extracelular e fatores solúveis é denominado microambiente tumoral, local em que ocorre a primeira interação entre as células tumorais e as células do sistema imune do hospedeiro (NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017).

O fato das células tumorais embebidas, e em constante interação com o microambiente ao seu redor, faz com que diversas abordagens terapêuticas tenham proposto o complemento das terapias atuais, com drogas alvo-dirigidas para componentes deste microambiente tumoral, melhorando assim os resultados obtidos. Cada tecido é composto por uma mistura específica de células e componentes químicos, e, de forma geral, alguns exemplos de abordagem direcionadas a estes componentes estão esquematizados na Figura 5, retirada da revisão de (KLEMM; JOYCE, 2015).

Esta hipótese de terapia adjuvante ganhou relevância a partir do momento em que diversos trabalhos mostraram que não só a iniciação tumoral, como também a progressão maligna, metástase e até mesmo a resposta aos tratamentos antitumorais estão fortemente correlacionados aos sinais externos, vindos do microambiente tumoral, que é capaz de fornecer um local propício para processos malignos (KLEMM; JOYCE, 2015; MBEUNKUI; JOHANN, 2009). Aqui, como ressaltam Luciana Rodrigues Gomes e colaboradores (2019), a tumorigênese e progressão do câncer deixam de ser vistas como um processo autônomo da célula tumoral, e passam a ser vistos como um processo influenciado e até mesmo dirigido pelo *crosstalk* entre as células tumorais e o microambiente ao seu redor (GIUSSANI et al., 2015; GOMES et al., 2019).

Figura 5: Esquema representativo dos componentes do microambiente tumoral, e as principais terapias alvo-dirigidas. O microambiente tumoral é composto por células estromais (tais como células de vasos endoteliais ou linfáticos, fibroblastos e células mesenquimais), células do sistema imune (tais como macrófagos, células dendríticas, células T/T-regulatórias/B e MDSC - *myeloid derived suppressor cells*) e pelas próprias células tumorais. Todas essas populações ficam imersas em componentes de matriz extracelular. Todas estas células são capazes não só de modular o microambiente, como também o tratamento antitumoral, de forma que terapias alvo-dirigida mostram-se interessantes. Nesta frente, diversas abordagens vêm sendo testadas, envolvendo desde a inibição de processos como vascularização, inflamação e transição epitélio-mesenquimal, até a imunomodulação. Imagem adaptada de (Klemm and Joyce 2015).

Figura 5: Esquema representativo dos componentes do microambiente tumoral, e as principais terapias alvo-dirigidas

De acordo com a mini revisão publicada por Wu e Dai (2017), os principais componentes do microambiente tumoral são os fibroblastos associados ao tumor, as células imunes, as células endoteliais associadas ao tumor e a matriz extracelular, sendo que cada um destes componentes desempenha um papel fundamental na tumorigênese (WU; DAI, 2017).

Os fibroblastos associados ao câncer (CAF, do inglês *carcinoma-associated fibroblasts*) compreendem grande parte do estroma tumoral, sendo classificados também como fibroblastos ativos ou miofibroblastos. Conforme revisado recentemente por Hamidi e Ivaska (2018), os CAFs possuem um papel fundamental na progressão tumoral, atuando de forma pró-invasiva, por exemplo, por meio de secreção de metaloproteinases que atuam no remodelamento da matriz extracelular (KALLURI; ZEISBERG, 2006), ou através da geração de rastros de fibronectina que facilitam a migração de células tumorais tanto pela MEC estromal, quanto durante o escape destas células do sítio primário (HAMIDI; IVASKA, 2018). Além disso, os CAFs também são responsáveis pela secreção de fatores de crescimento como o VEGF e citocinas que facilitam ainda mais a progressão tumoral (INOUE et al., 2019; WANG et al., 2017).

Dentre as células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas, MDSC - *myeloid derived suppressor cells*, células NK - *natural killers*, linfócitos T e B), os macrófagos

associados ao tumor (TAM, do inglês *tumor associated macrophages*) são considerados fatores importantes na regulação de respostas terapêuticas. Originados a partir de células MDSCs que migram para o sítio tumoral e se diferenciam em TAMs, os macrófagos podem ser classificados de acordo com a sua polarização em M1, quando antitumorais; ou M2 quando pró-tumorais. Conforme revisado por Wu e Dai (2017), os TAMs ainda atuam na indução de resistência a quimioterapias com 5-fluorouracil, doxorubicina, gemcitabina, paclitaxel, e terapias anti-VEFG (WU; DAI, 2017).

As células endoteliais associadas ao tumor (TECs, do inglês *tumor-associated endothelial cells*) são responsáveis pela vascularização tumoral, apresentando comportamento proliferativo e migratório distinto das células endoteliais normais. Adicionalmente, as TECs facilitam o desenvolvimento tumoral por meio de inibição de células T por intermédio da expressão de moléculas inibitórias como o PDL1 (do inglês *programmed cell death ligant 1*), e secreção de fatores pró-tumorais como IL-6, TGF β e VEGF (MULLIGAN; YOUNG, 2010).

Outro elemento fundamental na tumorigênese é a matriz extracelular (MEC), e a interação célula-MEC é determinante durante o desenvolvimento tumoral. Ao contrário do tecido normal, o estroma tumoral está associado a uma matriz extracelular alterada, produzida pelas diferentes populações de células do microambiente. Isso confere às células tumorais não só uma maior habilidade invasiva e metastática, como também resistência a terapias (BISSELL; RADISKY, 2001; GOMES et al., 2019). O principal componente na adesão célula-MEC são as integrinas, que se encontram frequentemente alteradas nos tumores. Sua atuação na tumorigênese se dá por meio da indução de migração e invasão tumoral, mediada pela ligação com fatores de crescimento, aumento da sinalização celular *outside-in*, facilitação da ancoragem de células tumorais circulantes e aumento da atividade proteolítica, acarretando em remodelamento de estroma tumoral (HAMIDI; IVASKA, 2018).

Além de todos os elementos supracitados, o microambiente mamário ainda se mostra único por ser composto predominantemente por adipócitos (Mao et al. 2013; Place, Jin Huh, and Polyak 2011; Fletcher et al. 2017). Em 2009, um artigo publicado por Walter e colaboradores, demonstrou que os adipócitos estromais derivados de tecido mamário livre de câncer são capazes de promover a migração e invasão tumoral de células MDA-MB-231, por meio da secreção de interleucina 6 (IL-6), e que esta ação depende de cofilina-1, uma

proteína que tem um papel importante na polimerização dos filamentos de actina (WALTER et al., 2009).

Corroborando com os ensaios *in vitro*, em 2017, um artigo publicado por Noman e colaboradores comparou os níveis clínicos de IL-6 em 130 pacientes com câncer de mama e 30 pacientes saudáveis. No estudo, a sobrevida global dos voluntários foi monitorada, e observou-se um aumento de 63% nos níveis séricos de IL-6 dos pacientes com tumores metastáticos, quando comparados aos pacientes saudáveis, havendo uma correlação entre os altos níveis de IL-6 e uma pior evolução clínica, frequentemente associada à metástase óssea (NOMAN et al., 2017).

Mais recentemente, Jones Gyamfi e colaboradores (2018) mostraram que o efeito pró-transição epitélio mesenquimal de IL-6 ocorre por meio da ativação de STAT3 (do inglês: *signal transducer and activated transcription 3*). Adicionalmente, um artigo publicado em março deste ano (2019) por Weng e colaboradores identificou o MCT-1 (do inglês *Multiple Copies in T-cell Malignancy 1*) como um novo marcador de prognóstico ruim em pacientes com câncer de mama invasivo, e que a superexpressão deste oncogene em células MDA-MB-231 acarreta em uma maior secreção de IL-6, que, por sua vez, promove a polarização de monócitos THP-1 em macrófagos M2, aumentando significativamente a invasão tumoral (WENG et al., 2019). Estes dados apontam que a IL-6 possui um papel tanto direto quanto indireto na transição epitélio mesenquimal.

Neste contexto, outro fator solúvel importante no desenvolvimento tumoral mamário é a interleucina 8 (IL-8), uma quimiocina apontada há mais de uma década como potencial fator metastático no câncer de mama. Em 2017, um grupo de pesquisadores do NIH (*National Institute of Health*) analisou o potencial de indução de transição epitélio-mesenquimal da IL-8. Para isso, a secreção de IL-8 por células MDA-MB-231 foi neutralizada com anticorpo HuMax-IL8 e quantificou-se a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais. A neutralização de IL-8 não só aumentou a expressão de marcadores epiteliais como ZO-1, E-caderina e ocludina, como também diminuiu a expressão de marcadores mesenquimais fibronectina, vimentina, snail e twist1 (DOMINGUEZ et al., 2017).

Um artigo publicado recentemente mostrou que a co-cultura de adipócitos maduros com células tumorais mamárias MDA-MB-231, acarreta em um aumento da

secreção das interleucinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 pelas células tumorais (Nickel et al. 2018). Interessantemente, ambas as interleucinas aumentadas são conhecidas por exercer um papel pró-metastático no câncer de mama, conferindo ao tumor um fenótipo altamente proliferativo, migratório e invasivo (DE LARCO et al., 2001; GILBERT; SLINGERLAND, 2013; WALTER et al., 2009).

1.5.2 Angiogênese

Sabe-se que os vasos sanguíneos são responsáveis pelo aporte de oxigênio e nutrientes para todos os órgãos, atuando em importantes processos como crescimento e reparação tecidual. Conforme revisado por Potente e colaboradores (2012), disfunções nos vasos sanguíneos podem acarretar no surgimento de diversas complicações como infarto do miocárdio e doenças neurodegenerativas. Por outro lado, no câncer, a angiogênese tumoral é caracterizada por um processo multifatorial, que requer o *crosstalk* entre as células tumorais e o microambiente, orquestrado pela superexpressão de fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF, determinantes para o *switch* angiogênico (FAN et al., 2012), que promove o crescimento de tumores por meio da entrega de oxigênio e nutrientes, e também facilitando a metástase por meio de diapedese (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011).

Nesta mesma revisão, os autores citam que os vasos sanguíneos tumorais possuem estrutura e função anormal, com regiões de densa vascularização, cercadas por regiões pobres em vasos sanguíneos, que se apresentam irregulares, tortuosos e com lúmen comprimido. Como consequência desta perfusão sanguínea irregular, o aporte de nutrientes e oxigênio apresenta-se inibido, fazendo com que as células tumorais passem a secretar fatores angiogênicos na tentativa de compensar a função vascular intratumoral. Recentemente, Lee e Djamgoz publicaram uma revisão literária avaliando o progresso atual no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, com ênfase na importância de biomarcadores preditivos e terapias combinadas (LEE; DJAMGOZ, 2018).

Dentre os marcadores levantados, destaca-se o VEGF, que – correlacionado com menor sobrevida de pacientes com superexpressão deste fator e alto índice de vascularização –, apontado anteriormente por Linderholm e colaboradores (2009) como um potencial alvo para o tratamento neoadjuvante de TNBC. No estudo, os pesquisadores quantificaram a expressão intratumoral de VEGF em 679 pacientes diagnosticados com

câncer de mama, correlacionando estes dados com a agressividade tumoral. Dos 679 tumores avaliados, os 87 classificados como triplo-negativo apresentaram 3 vezes mais VEGF do que os tumores “não triplo-negativos” (LINDERHOLM et al., 2009), sugerindo uma potencial eficácia em abordagens antiangiogênicas para este tipo de câncer.

Corroborando com esses dados, a revisão de Lee e Djamgoz (2018), aponta que, atualmente, o tratamento do TNBC com anticorpo monoclonal bevacizumab – que foi a primeira droga antiangiogênicas aprovada para o tratamento do câncer, e atua se ligando e inativando VEGF A –, vem sendo utilizado em combinação com a administração de paclitaxel, que por sua vez atua inibindo a divisão celular impedindo a desmontagem dos microtúbulos.

Tendo em vista esta melhora no resultado de pacientes que recebem tratamento neoadjuvante à quimioterapia, recentemente, um grupo de pesquisadores do *Hellenic Oncology Research Group* realizou um estudo clínico de fase 2, para avaliar a atividade e toxicidade da administração semanal de paclitaxel e carboplatina, em combinação com administração quinzenal de bevacizumab como a primeira linha de terapia em pacientes com TNBC metastático. Neste estudo, a proporção de pacientes com redução de 65,2% do tamanho do tumor foi atingida por 15,2% dos pacientes de forma completa, e 50% dos pacientes de forma parcial, sugerindo que essa abordagem seja adequada à pacientes com TNBC metastático (SALOUSTROS et al., 2018).

A Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA disponibiliza uma listagem de ensaios clínicos em andamento pelo mundo, acessível através do website www.clinicaltrials.gov. Sabendo que tanto o Apatinib quanto o Bevacizumab atuam na inibição de VEGF, se ligando ao VEGF circulante e ao receptor VEGF A, respectivamente, levantamos o número de ensaios clínicos que propõe a administração destes compostos no tratamento do câncer de mama. Atualmente existem 10 ensaios clínicos envolvendo a administração de Apatinib no tratamento do câncer de mama triplo negativo, e mais 17 ensaios propondo a utilização de Bevacizumab.

Se estendermos a pesquisa à “câncer de mama”, o número de ensaios clínicos envolvendo a administração de moléculas anti-VEGF sobe para 19 usando Apatinib, e 200 ensaios com Bevacizumab (www.clinicaltrials.gov acesso em 06/03/2019 às 12:00hrs),

sugerindo a importância de abordagens que combinam terapias antiangiogênicas com quimioterapias convencionais, no tratamento de tumores.

A presença de IL-8 no microambiente tumoral também está correlacionada a uma elevada taxa de angiogênese. A secreção desta interleucina por células tumorais também atua em processos de proliferação e migração das células tumorais (LONG et al., 2016). Um artigo publicado recentemente comparou a densidade microvascular de tumores mamários, derivados do xenotransplante de células MDA-MB-231, contendo ou não adipócitos tumorais. No trabalho, os tumores desenvolvidos na presença de adipócitos, e que, conseqüentemente, apresentavam maiores concentrações de IL-8 no microambiente, mostraram-se 2,25 vezes mais vascularizados do que os demais. Além disso, os pesquisadores também mostraram que a quantidade de IL-8 está diretamente relacionada à agressividade tumoral, encontrando-se comumente superexpressa em tumores que não apresentam receptor de estrógeno, como o TNBC (AL-KHALAF et al., 2019).

Apesar de aparentemente promissores, os tratamentos atuais de carcinoma mamário invasivo com moléculas anti-VEGF mostram-se contraditórios. Um trabalho publicado recentemente (2017) por Ueda e colaboradores avaliou a resposta terapêutica à combinação bevacizumab + paclitaxel em 28 pacientes diagnosticados com câncer de mama invasivo em estágio III/IV, e concluiu-se que a administração em condições de hipóxia (característico dos tumores não responsivos) acarretou em aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e IL-1beta e de fatores angiogênicos (UEDA et al., 2017).

Com relação ao Apatinib, um estudo publicado em junho deste ano (2019) por Anjie Zhu e colaboradores analisou a eficácia e segurança da administração de Apatinib, em 85 pacientes com câncer de mama invasivo previamente tratados com antraciclinas ou taxanos. Dos 85 pacientes, 27 tiveram o tratamento adaptado devido à efeitos adversos, e 5 pacientes tiveram o tratamento interrompido devido à efeitos adversos graves (mielossupressão, reação intestinal e mucosite) com um período médio de tratamento de 1,2 meses. Sabe-se que a mielossupressão é a toxicidade mais comum associada ao tratamento com Apatinib, caracterizada por anemia, neutropenia, leucopenia e trombocitopenia, e no estudo supracitado, 49,4% dos pacientes apresentaram mielossupressão durante o tratamento combinado (ZHU et al., 2019).

Assim, apesar de promissoras, estas abordagens ainda apresentam muitos efeitos colaterais indesejados. Dessa forma, a busca por novos compostos que atuem de forma eficiente nos aspectos centrais do estabelecimento, promoção e progressão tumoral permanece fundamental.

1.6 A busca por novas abordagens terapêuticas: Produtos Naturais

Frente a este cenário de falta de terapia eficaz e excesso de efeitos colaterais, muitos estudos estão buscando novos compostos bioativos com funções antitumorais. Dentre eles, os produtos naturais vêm ganhando atenção ao longo das últimas décadas. Trata-se de pequenas moléculas com massa molar menor do que 3000 Da, produzidas a partir de uma fonte biológica como plantas, animais, micro-organismos, e que tenha a ocorrência limitada à determinada família taxonômica, gênero, espécie ou até mesmo a um único organismo (MARTINS et al., 2014).

Estes compostos, em geral, são metabólitos secundários, produzidos pelos organismos em algumas condições especiais como proteção (contra patógenos e predadores), e competição (por espaço e alimento), não estando envolvidos em vias de sinalização “básicas” de crescimento, desenvolvimento e reprodução, e, por isso, apresentam relevância frente aos demais compostos naturais (MARTINS et al., 2014). Adicionalmente, vale salientar que estes organismos surgiram nos tempos ancestrais, passando por um longo caminho de adaptação e evolução, que reflete a peculiaridade e grande variedade dos compostos bioativos de lá derivados.

Os mares e oceanos ocupam cerca de 71% de toda superfície terrestre e foram o habitat responsável pelo surgimento da vida na terra, abrigando uma imensa diversidade de organismos, correspondentes à metade da biodiversidade mundial. A ampla variedade de habitats marinhos acarreta em uma grande variedade química e biológica de moléculas (CARTÉ, 1996), com características distintas daquelas encontradas em ambientes terrestres (KIJOA; SAWANGWONG, 2004). Curiosamente, 30% dos filos são exclusivamente marinhos, contra apenas 1% dos filos mostrando-se exclusivamente terrestres.

Desta forma, este ambiente vem ganhando destaque como fonte de novas moléculas bioativas ao longo das últimas décadas, contando com um total de 2908 drogas aprovadas (NOVICK et al., 2013) e um total de 28609 produtos naturais marinhos

reportados desde 1957 (<http://pubs.rsc.org/marinlit>, acessado em jul/2017 - ("*MarinLit - A Database of the Marine Natural Products Literature*" n.d.)).

Estas novas moléculas, que representam 1% de todas as substâncias bioativas reportadas até o momento, apresentam atividades diversas, como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, anticoagulante e até mesmo antitumoral (NEWMAN; CRAGG, 2016). Mais recentemente, Blunt e colaboradores (2018) mostraram que, só no ano de 2015, pelo menos 1340 novos compostos derivados de organismos marinhos e com relevante atividade biológica foram descobertos. Este número é ligeiramente maior do que o levantado em 2016, com 1277 novos compostos (BLUNT et al., 2017, 2018; SAWANGWONG et al., 2008).

Dentre os organismos estudados como fonte destas novas moléculas, destacam-se os invertebrados, que juntos, foram responsáveis pela descoberta de 42% do total das novas moléculas publicadas em 2016. Isso representa 526 compostos, dentre os quais 12% são oriundos dos equinodermos (BLUNT et al., 2018), e diversos grupos de pesquisa vêm atuando na validação da capacidade destas substâncias bioativas em interagir com diferentes alvos moleculares e, assim, modular o desenvolvimento tumoral por meio da inibição da proliferação, migração e agressividade celular.

1.6.1 Utilização de compostos naturais no câncer de mama

No câncer de mama, diversos compostos fenólicos já tiveram a sua atividade antitumoral testada. Os estudos abrangem desde a validação dos efeitos biológicos de extratos de diferentes espécimes, até o isolamento e validação de uma única molécula bioativa, podendo esta ser natural ou sintética. Tais componentes vêm sendo adicionados a diversos fármacos, cosméticos, suplementos alimentares e agroquímicos, incorporando estas moléculas marinhas à um novo patamar de estudos.

Dentre as moléculas isoladas de animais marinhos, encontram-se diversos grupos fenólicos que já tiveram a sua atividade microbida e citotóxica validada (KUMAR; PANDEY, 2013). Estes componentes fazem parte de um amplo grupo de metabólitos secundários, encontrados em abundância na natureza. Sua estrutura química varia desde fenóis simples, que contém apenas um anel benzênico em sua conformação, até complexos polifenóis, que apresentam duas ou mais estruturas cíclicas.

Dentro do grupo de compostos policíclicos, estão as quinonas, que estruturalmente apresentam a substituição de grupos $-\text{CH}=\text{}$ por grupos $-\text{C}(=\text{O})$, englobando diversas moléculas que são classificadas de acordo com a posição de $\text{C}=\text{O}$ e do número de anéis aromáticos.

A atuação dos compostos fenólicos nos tumores de mama se dá de diferentes formas, reconhecendo-se a ação antiangiogênica, de extratos derivados de plantas medicinais africanas (HASSAN et al., 2014), ação antiproliferativa e antioxidantes de extratos derivados de plantas europeias (*M. crassidens* - (HAMEDEYAZDAN et al., 2014) , japonesas (*Oryza sativa* L. – (CHUNG et al., 2015)) e indianas (KAUR et al., 2014), e a ação pró-apoptótica de extratos derivados de plantas chinesas (AHMAD et al., 2008).

Um estudo publicado recentemente, demonstrou a ação antitumoral de NFD (nafto[1,2-b]furan-4,5-dione, uma naftoquinona derivada de *Avicennia marina*) em células derivadas de carcinoma mamário. A ação se dá através da inibição da ativação da via PI3K/Akt, promovendo o bloqueio da migração e da invasão celular (TSAI et al., 2014b). Além disso, a inibição de proliferação celular através de promoção de parada de ciclo em fase-S, e indução de apoptose também já foram descritas para esta naftoquinona, na mesma linhagem celular de carcinoma mamário (LIN et al., 2010).

1.6.2 Equinocromo A: um potencial composto natural para o tratamento do câncer

Dentre os muitos filos que ocorrem no ambiente marinho, os equinodermos contêm diversos compostos de particular interesse, como as polihidroxi-naftoquinonas (PHNQ). Dentre as PHNQs, destacam-se os pigmentos conhecidos como espinocromos A/B/C e E e o equinocromo A, presentes em todos os órgãos dos equinodermos, e representados na Figura 6. Recentemente, Brasseur e colaboradores (2018) avaliaram a ação citotóxica de 4 tipos de espinocromos - derivados de quatro espécies diferentes de ouriço-do-mar -, em células HeLa, e observaram uma pronunciada ação citotóxica do espinocromo E (BRASSEUR et al., 2018). Porém, a atividade citotóxica do EchA não foi avaliada de forma isolada, e, dada a semelhança molecular entre o espinocromo E e o equinocromo A, um estudo que avalie a atuação deste composto em células tumorais mostra-se interessante.

Sabe-se que o líquido celomático de ouriço-do-mar apresenta diferentes tipos celulares: células vibráteis, amebócitos fagocíticos, esferulócitos incolores e vermelhos. Os últimos apresentam grânulos ricos no pigmento naftoquinóide Equinocromo A (Figura 6 - Echinochrome A). Trata-se de uma 1,4 naftoquinona solúvel em etanol e insolúvel em água, quimicamente denominada 6-etil-2,3,5,7,8-pentahidroxi-1,4- naftoquinona, composta por 5 grupos hidroxila, dois grupos carboxila e um grupo etil (Figura 6), sendo a substância ativa (P-N002362/01) da droga HistoChrome®, desenvolvida por um grupo de pesquisadores russos para o tratamento do glaucoma (EGOROV et al., 1999).

Figura 6: Representação estrutural dos principais pigmentos derivados de ouriço-do-mar.
Retirado de (Brasseur et al. 2017)

A presença de grupos hidroxila (OH) em compostos fenólicos permite a sua atuação no tratamento do câncer por meio da interação destas moléculas com alguns grupos funcionais de diversas proteínas (p.e. aminas e guaninas), alterando a conformação das mesmas por meio do compartilhamento de prótons (CHARLTON et al., 2002; HE; LV; YAO, 2007).

As naftoquinonas são bastante estudadas por apresentarem bio dinamicidade farmacológica, podendo ter ação bactericida (SERVICE; WARDLAW, 1984), anti-inflamatória e antioxidante (EL-NAJJAR et al., 2011). Estudos pioneiros também mostram a atividade antitumoral de compostos 1,2- e 1,4-naftoquinonas, semelhantes ao EchA, e que atuam por meio da citotoxicidade exercida sobre linhagens celulares (KONGKATHIP et al., 2003).

Outros componentes como a plumbagina, uma 1,4-naftoquinona: C₁₁H₈O₃ isolada de uma planta medicinal, também se assemelha ao EchA, e destaca-se por sua ação antitumoral, atuando na inibição da angiogênese em células endoteliais HUVEC (LAI et al., 2012), apresentando ação antiproliferativa em células tumorais ovarianas (SINHA et al., 2013) e células tumorais pancreáticas (HAFEEZ et al., 2012), e inibindo a metástase de células derivadas de câncer de próstata. Paralelamente, um estudo publicado recentemente, mostrou um aumento de apoptose e necrose em populações de células tumorais expostas aos híbridos criados a partir de 1,4-naftoquinona, indicando uma ação antiproliferativa destas moléculas (MALLAVADHANI et al., 2014).

Adicionalmente, naftoquinonas isoladas e/ou sintetizadas também já tiveram a sua atividade testada em células derivadas de carcinoma mamário. Dentre elas, destacam-se algumas moléculas estruturalmente semelhantes ao EchA, como a MNQ (2-metoxi-1,4-naftoquinona), que, quando administrado em doses sub tóxicas ($\leq$ IC₂₀), atua inibindo a migração e a invasão de células MDA-MB-231, caracterizando uma diminuição do potencial metastático desta linhagem, confirmada pela diminuição da atividade de MMP-9 (LIEW et al., 2014). Em outro estudo, moléculas análogas à 1,4-naftoquinonas foram sintetizadas e tiveram a sua atividade testada em diversas linhagens tumorais humanas, incluindo as células MCF-7, que apresentaram diminuição de tumorigênese mediada pela citotoxicidade exercida pelos compostos fabricados (KISHORE et al., 2014).

Recentemente, dois trabalhos envolvendo uma naftoquinona isolada de *A. marina* (NFD: nafto[1,2-b]furan-4,5-dione) relataram a sua atuação na tumorigênese de células MDA-MB-231 através de inibição da migração e invasão celular: 1. Induzida por EGF, por meio do bloqueio dose-dependente da expressão de MMP-9, fosfo-PI3K, fosfo-Akt, e do fator de transcrição AP-1 (HSIEH et al., 2013); 2. Induzido por Src, por meio da diminuição da fosforilação de alvos *downstream* a Src, como PI3K e Akt (TSAI et al., 2014b); e 3. Induzido por HGF, por meio da modulação das vias PI3K/Akt e NFκβ, levando a uma diminuição na expressão de MMP-9 (TSAI et al., 2014a).

Estes dados mostram que um único composto quinóide é capaz de atuar em diferentes processos, por meio da habilidade que estas moléculas fenólicas têm de interagir com diferentes proteínas, tornando-os capazes de modular diversas vias de sinalização, o que lhes confere um importante papel no tratamento do câncer.

6 CONCLUSÃO

A utilização de RP-HPLC seguida por espectrometria de massas para a purificação de EchA a partir do líquido celomático de 25 espécimes de ouriço-do-mar *L. variegatus* mostrou-se eficiente, possibilitando a produção de 15 ml de solução alcoólica de EchA a uma concentração de 10mM, utilizado durante todo desenvolvimento do trabalho.

O efeito citotóxico do EchA se deu de forma dose e tempo-dependente em todas as linhagens celulares estudadas, sendo que as células que apresentaram menor sensibilidade ao composto foram os fibroblastos, e as células mais sensíveis foram as células MCF10A. Dentre as linhagens tumorais, a mais agressiva MDA-MB-231 mostrou-se mais sensível quando comparada à MCF7.

O EchA altera a morfologia de ambas as linhagens tumorais mamárias MCF7 e MDA-MB-231, acarretando no surgimento de estruturas de actina em formato "*ring-like*" na região perinuclear das células, e no aparecimento de agregados de actina polimerizados de forma não linear por todo citoplasma celular.

A viabilidade de células MDA-MB-231 não é alterada após o tratamento prolongado com baixas concentrações de EchA, porém, observa-se uma diminuição no potencial migratório e invasivo destas células, por meio de alterações na organização de F-actina e α -tubulina, alteração na distribuição espacial de fosfo-FAK e inibição da ativação de cdc42. O EchA não é capaz de sensibilizar as células MDA-MB-231 ao tratamento com tamoxifeno, uma vez que a sua utilização combinada a concentrações subtóxicas do quimioterápico, ocasiona apenas uma sutil diminuição no número de células viáveis. Esta diminuição torna-se significativa apenas quando concentrações muito elevadas de tamoxifeno são utilizadas.

O EchA altera o perfil de citocinas secretadas por células MDA-MB-231 no microambiente tumoral, inibindo a secreção das interleucinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e IL-1 β . Como consequência, o meio condicionado por células MDA-MB-231 expostas ao EchA diminui o potencial angiogênico de células endoteliais HUVECs.

Desta forma, com base nos dados obtidos neste trabalho, concluímos que apesar de não ser capaz de induzir a morte celular em linhagens tumorais mamárias, o EchA mostra-se eficaz em diminuir o potencial migratório e invasivo de células MDA-MB-231, principalmente por meio de alterações na morfologia de componentes do citoesqueleto: F-actina e α -tubulina, e inibição da ativação de Cdc42.

Apesar de não atuar de forma citotóxica diretamente nas células tumorais, o EchA foi capaz de inibir o processo de angiogênese de forma indireta, inibindo a secreção das interleucinas 6, 8 e 1 β por células tumorais mamárias. Como consequência, as células endoteliais HUVECs apresentaram um menor potencial angiogênico quando tratadas com o meio condicionado das células tumorais MDA-MB-231 expostas ao EchA. Assim, concluímos que o EchA possa ser um potencial terapêutico coadjuvante no tratamento do TNBC, através de seu efeito antiangiogênico, porém, mais estudos fazem-se necessários.

7 REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. et al. Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1461–1471, 15 dez. 2008.
- AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 12, p. 711–726, dez. 2015.
- ALFARO, C. et al. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 15, p. 3924–3936, 1 ago. 2016.
- AL-KHALAF, H. H. et al. Interleukin-8 Activates Breast Cancer-Associated Adipocytes and Promotes Their Angiogenesis- and Tumorigenesis-Promoting Effects. **Molecular and cellular biology**, v. 39, n. 2, 15 jan. 2019.
- AMAROWICZ, R.; SYNOWIECKI, J.; SHAHIDI, F. Sephadex LH-20 separation of pigments from shells of red sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*). **Food chemistry**, v. 51, n. 2, p. 227–229, 1 jan. 1994.
- AMAROWICZ, R.; SYNOWIECKI, J.; SHAHIDI, F. **Chemical composition of shells from red (*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus droebachiensis*) sea urchin** *Food Chemistry*, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.099>>
- ANDERSON, H. A.; MATHIESON, J. W.; THOMSON, R. H. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 28, n. 1, p. 333–345, jan. 1969.
- BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of cell science**, 2012.
- BENOY, I. H. et al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 21, p. 7157–7162, 1 nov. 2004.
- BINOY, A. et al. Plumbagin induces paraptosis in cancer cells by disrupting the sulfhydryl homeostasis and proteasomal function. **Chemico-biological interactions**, v. 310, p. 108733, 1 set. 2019.
- BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46–54, out. 2001.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 34, n. 3, p. 235–294, 17 mar. 2017.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 35, n. 1, p. 8–53, 16 jan. 2018.
- BORDONARO, S. et al. The Real Impact of Target Therapy in Breast Cancer Patients: Between Hope and Reality. **Current cancer drug targets**, v. 18, n. 5, p. 480–498, 2018.

BRASSEUR, L. et al. The Roles of Spinochromes in Four Shallow Water Tropical Sea Urchins and Their Potential as Bioactive Pharmacological Agents. **Marine drugs**, v. 15, n. 6, 16 jun. 2017.

BRASSEUR, L. et al. Identification and quantification of spinochromes in body compartments of *Echinometra mathaei*'s coloured types. **Royal Society open science**, v. 5, n. 8, p. 171213, ago. 2018.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

CAREY, L. A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329–2334, 15 abr. 2007.

CARTÉ, B. K. Biomedical Potential of Marine Natural Products. **Bioscience**, v. 46, n. 4, p. 271–286, 1996.

CHARLTON, A. J. et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1593–1601, 13 mar. 2002.

CHUNG, N.-J. et al. Rice Hull Extracts Inhibit Proliferation of MCF-7 Cells with G1 Cell Cycle Arrest in Parallel with Their Antioxidant Activity. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 3, p. 314–323, 1 mar. 2015.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The Journal of cell biology**, v. 105, n. 4, p. 1473–1478, out. 1987.

DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281–1294, 23 jun. 2016.

DANG, T. T.; PRECHTL, A. M.; PEARSON, G. W. Breast cancer subtype-specific interactions with the microenvironment dictate mechanisms of invasion. **Cancer research**, v. 71, n. 21, p. 6857–6866, 1 nov. 2011.

DE LARCO, J. E. et al. A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 2, p. 639–646, fev. 2001.

DEMALI, K. A.; WENNERBERG, K.; BURRIDGE, K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. **Current opinion in cell biology**, v. 15, n. 5, p. 572–582, out. 2003.

DE, U. et al. Plumbagin from a tropical pitcher plant (*Nepenthes alata* Blanco) induces apoptotic cell death via a p53-dependent pathway in MCF-7 human breast cancer cells. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 123, p. 492–500, jan. 2019.

DOMINGUEZ, C. et al. Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. **JCI insight**, v. 2, n. 21, 2 nov. 2017.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 10, p. 790–803, out. 2010.

EGOROV, E. A. et al. HistoChrome, a new antioxidant, in the treatment of ocular diseases. **Vestnik oftalmologii**, v. 115, n. 2, p. 34–35, 1999.

EL-KENAWI, A. E.; EL-REMESSY, A. B. **Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: mechanistic perspective on classification and treatment rationales** *British Journal of Pharmacology*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/bph.12344>>

EL-NAJJAR, N. et al. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry reviews: proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 10, n. 3, p. 353, 1 set. 2011.

FAN, F. et al. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. **Journal of oncology**, v. 2012, p. 281261, 2012.

FEDOREYEV, S. A. et al. Antiviral and Antioxidant Properties of Echinochrome A. **Marine drugs**, v. 16, n. 12, 15 dez. 2018.

FERNANDO, R. I. et al. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. **Cancer research**, v. 71, n. 15, p. 5296–5306, 1 ago. 2011.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. **The biology of VEGF and its receptors** *Nature Medicine*, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-669>>

FLETCHER, S. J. et al. Human breast adipose tissue: characterization of factors that change during tumor progression in human breast cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 36, n. 1, p. 26, 7 fev. 2017.

FOERSTER, F. et al. Pharmacological characterization of actin-binding (-)-doliculide. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 18, p. 5117–5122, 15 set. 2014.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-negative breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 11 nov. 2010.

GILBERT, C. A.; SLINGERLAND, J. M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 45–57, 2013.

GINESTIER, C. et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 2, p. 485–497, fev. 2010.

GIUSSANI, M. et al. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. 3–10, dez. 2015.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, ago. 2011.

GOMES, L. R. et al. ATR mediates cisplatin resistance in 3D-cultured breast cancer cells via translesion DNA synthesis modulation. **Cell death & disease**, v. 10, n. 6, p. 459, 12 jun. 2019.

GUIU, S. et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. **Annals of oncology: official journal of the European Society for**

Medical Oncology / ESMO, v. 23, n. 12, p. 2997–3006, dez. 2012.

GUO, C. et al. Liposomal Nanoparticles Carrying anti-IL6R Antibody to the Tumour Microenvironment Inhibit Metastasis in Two Molecular Subtypes of Breast Cancer Mouse Models. **Theranostics**, v. 7, n. 3, p. 775–788, 26 jan. 2017.

GYAMFI, J. et al. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8859, 11 jun. 2018.

HAFEEZ, B. B. et al. **Plumbagin, a plant derived natural agent inhibits the growth of pancreatic cancer cells in in vitro and in vivo via targeting EGFR, Stat3 and NF- κ B signaling pathways** *International Journal of Cancer*, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.27478>>

HAMEDEYAZDAN, S. et al. Evaluating Antiproliferative and Antioxidant Activity of Marrubium crassidens. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. Supl 1, p. 459–464, out. 2014.

HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 18, n. 9, p. 533–548, set. 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer** *Cell*, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HE, Q.; LV, Y.; YAO, K. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase. **Food chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1178–1182, 1 jan. 2007.

HERKOMMER, D. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of simplified side chain hybrids of the potent actin binding polyketides rhizopodin and bistramide. **ChemMedChem**, v. 10, n. 3, p. 470–489, mar. 2015.

HOLEN, I. et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. **Oncotarget**, v. 7, n. 46, p. 75571–75584, 15 nov. 2016.

HOSHINO, A. et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. 329–335, 19 nov. 2015.

HOU, Y. et al. **Extraction, structural characterization and stability of polyhydroxylated naphthoquinones from shell and spine of New Zealand sea urchin (Evechinus chloroticus)** *Food Chemistry*, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.046>>

HSIEH, C.-Y. et al. **Inhibition of EGF/EGFR activation with naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells** *Toxicology in Vitro*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.10.001>>

INOUE, K.-I. et al. Cancer-associated fibroblasts show heterogeneous gene expression and induce vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in response to environmental stimuli. **Annals of Gastroenterological Surgery**, 2019.

JEONG, S. H. et al. Echinochrome A protects mitochondrial function in cardiomyocytes against

cardiotoxic drugs. **Marine drugs**, v. 12, n. 5, p. 2922–2936, 13 maio 2014a.

JEONG, S. H. et al. Echinochrome a increases mitochondrial mass and function by modulating mitochondrial biogenesis regulatory genes. **Marine drugs**, v. 12, n. 8, p. 4602–4615, 21 ago. 2014b.

JIN, K.; PANDEY, N. B.; POPEL, A. S. **Crosstalk between stromal components and tumor cells of TNBC via secreted factors enhances tumor growth and metastasis***Oncotarget*, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.19417>>

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, maio 2006.

KAPLAN, G.; BERTHEUSSEN, K. The morphology of echinoid phagocytes and mouse peritoneal macrophages during phagocytosis in vitro. **Scandinavian journal of immunology**, v. 6, n. 12, p. 1289–1296, 1977.

KAUR, P. et al. Suppression of SOS response in E. coli PQ 37, antioxidant potential and antiproliferative action of methanolic extract of Pteris vittata L. on human MCF-7 breast cancer cells. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 74, p. 326–333, 1 dez. 2014.

KAZAMI, S.; USUI, T.; OSADA, H. Actin stress fiber retraction and aggresome formation is a common cellular response to actin toxins. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 9, p. 1853–1855, 7 set. 2011.

KHAZAEI, M.; PAZHOUHI, M. Antiproliferative Effect of Trifolium Pratens L. Extract in Human Breast Cancer Cells. **Nutrition and cancer**, v. 71, n. 1, p. 128–140, 2019.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine drugs**, v. 2, n. 2, p. 73–82, 25 maio 2004.

KIM, H. K. et al. A Novel Atypical PKC- ι Inhibitor, Echinochrome A, Enhances Cardiomyocyte Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells. **Marine drugs**, v. 16, n. 6, 2 jun. 2018.

KISHORE, N. et al. **Cytotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines***Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.013>>

KITA, M. et al. Inhibition of microtubule assembly by a complex of actin and antitumor macrolide aplyronine A. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 48, p. 18089–18095, 4 dez. 2013.

KLEMM, F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. **Trends in cell biology**, v. 25, n. 4, p. 198–213, abr. 2015.

KONGKATHIP, N. et al. **Potent antitumor activity of synthetic 1,2-Naphthoquinones and 1,4-Naphthoquinones***Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(03\)00226-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(03)00226-8)>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 29 dez. 2013.

KUWAHARA, R. et al. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 7, p. 1296–1300, 1 set. 2009.

KUWAHARA, R. et al. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 8, p. 1185–1190, 1 out. 2010.

LAI, L. et al. **Plumbagin inhibits tumour angiogenesis and tumour growth through the Ras signalling pathway following activation of the VEGF receptor-2** *British Journal of Pharmacology*, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01532.x>>

LEE, A.; DJAMGOZ, M. B. A. Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. **Cancer treatment reviews**, v. 62, p. 110–122, jan. 2018.

LIANG, S. et al. **Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- κ B/IL-6 signals** *Cancer Letters*, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.003>>

LIEW, K. et al. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 28, n. 3, p. 335–339, abr. 2014.

LINDERHOLM, B. K. et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 20, n. 10, p. 1639–1646, out. 2009.

LIU, C.-Y. et al. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. **Breast cancer research: BCR**, v. 16, n. 5, p. 431, 17 set. 2014.

LI, X. et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 161, n. 2, p. 279–287, jan. 2017.

LONG, X. et al. IL-8, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor EMT via autocrine and paracrine pathways. **International journal of oncology**, v. 48, n. 1, p. 5–12, 2016.

MAJIENE, D. et al. Comparison of the Effect of Native 1,4-Naphthoquinones Plumbagin, Menadione, and Lawsone on Viability, Redox Status, and Mitochondrial Functions of C6 Glioblastoma Cells. **Nutrients**, v. 11, n. 6, 7 jun. 2019.

MALLAVADHANI, U. V. et al. Synthesis and anticancer activity of some novel 5,6-fused hybrids of juglone based 1,4-naphthoquinones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 83, p. 84–91, 18 ago. 2014.

MAO, Y. et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 32, n. 1-2, p. 303–315, jun. 2013.

MarinLit - A database of the marine natural products literature. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/marinlit>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

MARTINS, A. et al. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066–1101, 17 fev. 2014.

MBEUNKUI, F.; JOHANN, D. J., Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 571–582, mar. 2009.

MILLER, J. H. et al. Marine Invertebrate Natural Products that Target Microtubules. **Journal of natural products**, v. 81, n. 3, p. 691–702, 23 mar. 2018.

MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 56–68, jan. 2005.

MORTENSEN, K.; LARSSON, L.-I. Effects of cytochalasin D on the actin cytoskeleton: association of neoformed actin aggregates with proteins involved in signaling and endocytosis. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 60, n. 5, p. 1007–1012, maio 2003.

MULLIGAN, J. K.; YOUNG, M. R. I. Tumors induce the formation of suppressor endothelial cells in vivo. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 59, n. 2, p. 267–277, fev. 2010.

NAGARSHETH, N.; WICHA, M. S.; ZOU, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 17, n. 9, p. 559–572, set. 2017.

NALWOGA, H. et al. Vascular proliferation is increased in basal-like breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 130, n. 3, p. 1063–1071, dez. 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NICKEL, A. et al. Adipocytes induce distinct gene expression profiles in mammary tumor cells and enhance inflammatory signaling in invasive breast cancer cells. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9482, 21 jun. 2018.

NIGAM, M. et al. Marine anticancer drugs and their relevant targets: a treasure from the ocean. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 491–515, jun. 2019.

NIKKHAH, M. et al. The cytoskeletal organization of breast carcinoma and fibroblast cells inside three dimensional (3-D) isotropic silicon microstructures. **Biomaterials**, v. 31, n. 16, p. 4552–4561, jun. 2010.

NOMAN, A. S. et al. Serum sonic hedgehog (SHH) and interleukin-(IL-6) as dual prognostic biomarkers in progressive metastatic breast cancer. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1796, 11 maio 2017.

NOVICK, P. A. et al. SWEETLEAD: an in silico database of approved drugs, regulated chemicals, and herbal isolates for computer-aided drug discovery. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79568, 1 nov. 2013.

NOWAK-SLIWINSKA, P. et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 425–532, ago. 2018.

OBENAUF, A. C. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. **Nature**, v. 520, n. 7547, p. 368–372, 16 abr. 2015.

OSBORNE, C. K. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 22, p. 1609–1618, 26 nov. 1998.

PARK, J. H. et al. Therapeutic Cell Protective Role of Histochrome under Oxidative Stress in Human Cardiac Progenitor Cells. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, 21 jun. 2019.

PLACE, A. E.; JIN HUH, S.; POLYAK, K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. **Breast cancer research: BCR**, v. 13, n. 6, p. 227, 1 nov. 2011.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873–887, 16 set. 2011.

ROSENBLUM, M. D.; SHIVERS, R. R. “Rings” of F-actin form around the nucleus in cultured human MCF7 adenocarcinoma cells upon exposure to both taxol and taxotere. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 125, n. 1, p. 121–131, jan. 2000.

SALOUSTROS, E. et al. Weekly Paclitaxel and Carboplatin Plus Bevacizumab as First-Line Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. A Multicenter Phase II Trial by the Hellenic Oncology Research Group. **Clinical breast cancer**, v. 18, n. 1, p. 88–94, fev. 2018.

SAWANGWONG, P. et al. **Secondary metabolites from a marine sponge Cliona patera** *Biochemical Systematics and Ecology*, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2008.01.002>>

SERVICE, M.; WARDLAW, A. C. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 79, n. 2, p. 161–165, 1984.

SHOJI, K. et al. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin–cofilin interaction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 424, n. 1, p. 52–57, 20 jul. 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, jan. 2018.

SINHA, S. et al. Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in vivo. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 132, n. 5, p. 1201–1212, 1 mar. 2013.

SMITH, J. A. et al. Eribulin binds at microtubule ends to a single site on tubulin to suppress dynamic instability. **Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1331–1337, 16 fev. 2010.

SPECTOR, I. et al. **Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells** *Science*, 1983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.6681676>>

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14376–14381, 19 dez. 2000.

TILLE, J.-C.; PEPPER, M. S. Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. **Experimental cell research**, v. 280, n. 2, p. 179–191, 1 nov. 2002.

TSAI, P.-C. et al. **Inhibitory action of naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione on hepatocyte growth factor-induced migration and invasion of MDA-MB-231 cells. Mechanisms of action****Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1440-1681.12272>>

TSAI, P.-C. et al. Naphtho[1,2-b]furan-4,5-dione inhibits MDA-MB-231 cell migration and invasion by suppressing Src-mediated signaling pathways. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 387, n. 1-2, p. 101–111, 1 fev. 2014b.

UEDA, S. et al. Bevacizumab Induces Acute Hypoxia and Cancer Progression in Patients with Refractory Breast Cancer: Multimodal Functional Imaging and Multiplex Cytokine Analysis. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 19, p. 5769–5778, 1 out. 2017.

VELAZQUEZ, O. C. et al. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 10, p. 1316–1318, ago. 2002.

WALTER, M. et al. Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 28, n. 30, p. 2745–2755, 30 jul. 2009.

WANG, L. et al. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 76116–76128, 29 set. 2017.

WENG, Y.-S. et al. MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 42, 18 mar. 2019.

WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer letters**, v. 387, p. 61–68, 28 fev. 2017.

XU, J. et al. Shikonin induces an anti-tumor effect on murine mammary cancer via p38-dependent apoptosis. **Oncology reports**, v. 41, n. 3, p. 2020–2026, mar. 2019.

YANG, C.-P. H.; HORWITZ, S. B. Taxol®: The First Microtubule Stabilizing Agent. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, 9 ago. 2017.

ZHU, A. et al. **Apatinib combined with chemotherapy in patients with previously treated advanced breast cancer: An observational study****Oncology Letters**, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3892/ol.2019.10205>>